

Cara uji mikrobiologi -Bagian 4: Penentuan *Vibrio cholerae* pada produk perikanan



Daftar isi

Daftar isi.....	i
Prakata	ii
1 Ruang lingkup.....	1
2 Istilah dan definisi	1
3 Prinsip.....	2
4 Peralatan	2
5 Media dan pereaksi (Lampiran A dan B).....	2
6 Kondisi pengujian	3
7 Pengambilan contoh	3
8 Prosedur	4
9 Interpretasi hasil	8
10 Pelaporan hasil	8
11 Keamanan dan keselamatan kerja	8
Lampiran A (Informatif) Skema penentuan <i>Vibrio cholerae</i>	9
Lampiran B (Informatif) Karakteristik biokimia Vibrionaceae yang terdapat pada makanan laut.....	10
Lampiran C (normatif) Pembuatan media.....	11
Lampiran D (normatif) Pembuatan pereaksi.....	16
Bibliografi	20

Prakata

Dalam rangka memberikan jaminan mutu dan keamanan pangan terhadap komoditas yang akan dipasarkan di dalam dan luar negeri, maka perlu disusun suatu Standar Nasional Indonesia (SNI) tentang metode uji yang dapat memenuhi jaminan tersebut.

Standar ini menggantikan dari SNI 01-2341-1991 yang disusun oleh panitia teknis perikanan dalam rangka perbaikan setelah lima tahun yang telah dirumuskan melalui rapat konsensus pada tanggal 25 Agustus 2005 di Jakarta. Dihadiri oleh wakil-wakil produsen, konsumen, asosiasi, lembaga penelitian, perguruan tinggi serta instansi terkait sebagai upaya untuk meningkatkan jaminan mutu dan keamanan pangan.

Berkaitan dengan penyusunan Standar Nasional Indonesia ini, maka aturan-aturan yang dijadikan dasar atau pedoman adalah:

- 1 Peraturan Pemerintah No. 69 tahun 1999 tentang Label dan Iklan Pangan.
- 2 Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No. KEP. 01/MEN/2002 tentang Sistem Manajemen Mutu Terpadu Hasil Perikanan.
- 3 Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No. KEP. 06/MEN/2002 tentang Persyaratan dan Tata Cara Pemeriksaan Mutu Hasil Perikanan yang Masuk ke Wilayah Republik Indonesia.
- 4 Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No. KEP. 21/MEN/2004 tentang Sistem Pengawasan dan Pengendalian Mutu Hasil Perikanan untuk Pasar Uni Eropa.
- 5 Data verifikasi metode penentuan *Vibrio cholerae* pada produk perikanan Laboratorium Mikrobiologi BPPMHP 2004.

Cara uji mikrobiologi-Bagian 4: Penentuan *Vibrio cholerae* pada produk perikanan

1 Ruang lingkup

Standar ini digunakan untuk mendeteksi, mengisolasi dan mengkonfirmasi bakteri *Vibrio cholerae* pada produk perikanan.

2 Istilah dan definisi

2.1

inkubasi

pengkondisian mikroorganisma untuk tumbuh dan berkembang biak sesuai dengan suhu dan waktu yang diperlukan

2.2

koloni terduga

koloni-koloni yang tumbuh pada media agar selektif dan memberikan ciri-ciri *V. cholerae* yang khas. Koloni-koloni ini dikonfirmasi untuk meyakinkan benar tidaknya *V. cholerae*

2.3

media pengkayaan

media yang digunakan untuk memperbaiki sel-sel bakteri yang rusak atau meningkatkan jumlah populasi bakteri

2.4

media selektif

media yang mengandung bahan-bahan selektif untuk menghambat pertumbuhan bakteri selain bakteri yang dianalisa

2.5

media agar

media padat yang digunakan untuk pertumbuhan mikroorganisma

2.6

mikroorganisma

kelompok organisma yang berukuran kecil dan hanya dapat dilihat dibawah mikroskop

2.7

produk perikanan

ikan termasuk biota perairan lainnya yang ditangani dan/atau diolah untuk dijadikan produk akhir yang berupa ikan segar, ikan beku dan olahan lainnya yang digunakan untuk konsumsi manusia

2.8

***Vibrio cholerae* (*V. Cholerae*)**

bakteri gram-negatif, berbentuk batang pendek atau koma, dapat memfermentasi sukrosa pada media TCBS dan dapat bergerak karena adanya flagela polar.

3 Prinsip

Contoh yang diuji ditumbuhkan terlebih dahulu pada media pengkayaan dan dideteksi dengan menumbuhkan pada media agar selektif. Koloni-koloni yang diduga *V. cholerae* pada media agar selektif diisolasi kemudian dilanjutkan dengan konfirmasi melalui uji biokimia dan uji serologi untuk meyakinkan ada atau tidaknya *V. cholerae*.

4 Peralatan

- blender beserta jar yang dapat disterilisasi atau *stomacher* beserta plastik steril;
- cawan petri ukuran 15 mm x 100 mm;
- tabung reaksi ukuran 16 mm x 125 mm dan ukuran 13 mm x 100 mm;
- tabung bertutup ukuran 16 mm x 150 mm;
- timbangan analitik dengan ketelitian 0,01 g dan 0,0001 g;
- inkubator $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$;
- *waterbath* $42^{\circ}\text{C} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$;
- *autoclave* 121°C ;
- jarum inokulasi dan jarum ose;
- bunsen;
- pH meter;
- peralatan sterilisasi filter;
- *oven* ;
- pipet atau pippetor 1 ml, 5 ml dan 10 ml;
- mikroskop;
- *Hot plate* dilengkapi dengan *magnetic stirrer*;
- alat pengocok (*Vortex mixer*).

5 Media dan pereaksi (lampiran A dan B)

- *Alkaline Peptone Water* (APW) (A.1);
- *Alkaline Peptone Salt* (APS) (A.2);
- *Decarboxylase basal medium* dengan penambahan suplemen *arginine*, *lysine* dan *ornithine* secara individual (A.3);
- *Kliger Iron Agar* (KIA) (A.4);
- *Motility Test Medium* (MTM), *semisolid* (A.5);
- *MR-VP broth* (A.6);
- *Purple Broth Base* (PBB) dengan penambahan suplemen *sucrose*, *lactose*, *cellobiose*, *arabinose*, *D-mannitol* atau *D-mannose* secara individual (A.7);
- *OF medium semisolid* dengan penambahan suplemen *glucose*, *sucrose*, *lactose*, *cellobiose*, *arabinose*, *D-mannitol* atau *D-mannose* secara individual (A.8);
- *Triple Sugar Iron* (TSI) agar (A.9);
- *Thiosulfate-Citrate-Bile-Salts-Sucrose* (TCBS) agar (A.10);
- *Trypticase (tryptic) Soy Broth* (TSB) (A.11);
- *Trypticase (tryptic) Soy Agar* (TSA) (A.12);
- *Tryptone Broth and Tryptone Salt Broths* (T_1N_0 , T_1N_1 T_1N_3 T_1N_6 T_1N_8 T_1N_{10}) (A.13);
- *Urea broth* (A.14);
- Pereaksi kovacs (B.1);
- Mineral atau *parafin oil* steril (B.2);
- O/129 (2,4-diamino-6,7-diisopropyl pteridine) disk, 10 μg dan 150 μg (B3);
- ONPG disk (B.4);
- Pereaksi oksidase (B.5);
- HCl 1N (B.6);
- *Physiological saline* 0,85% (B.7);

- *Phosphate-Buffered Saline* (PBS), pH 7,4 (B.8);
- NaCl 2% dan 3% (B. 9);
- Larutan NaOH 1N (B. 10);
- Pereaksi VP (B.11);
- Pereaksi pewarnaan Gram (B. 12);
- Baku pembanding *Vibrio cholerae*;
- Anti serum *Poly Hikojima Inaba – Ogawa*.

6 Kondisi pengujian

Selama melakukan pengujian, terapkan teknis aseptis dan lakukan pengujian di ruangan atau *laminar air flow* yang terkontrol. Media TCBS agar yang digunakan harus dalam keadaan kering.

CATATAN Khusus untuk monitoring kekerangan, contoh kerang diuji dalam keadaan hidup jangan dibekukan

7 Pengambilan contoh

Komposisi dan berat contoh yang akan diuji diambil dengan ketentuan sebagai berikut:

7.1 Komposisi contoh

7.1.1 Ikan

Jaringan daging, saluran pencernaan dan insang.

7.1.2 Crustacea

Jika memungkinkan seluruh tubuh atau hanya bagian tengah termasuk insang dan saluran pencernaan.

7.1.3 Kekerangan

Daging kerang termasuk cairan dalam cangkang.

7.2. Berat contoh

7.2.1 Produk kekerangan

Dengan menerapkan teknik aseptis, ambil secara komposit daging kerang termasuk cairan dalam cangkang dari 10 kerang hingga 12 kerang (d disesuaikan dengan berat contoh), lalu homogenkan.

7.2.2 Produk perikanan selain kekerangan

7.2.2.1 Kurang dari 1 kg

Dengan menerapkan teknik aseptis ambil contoh secara acak dan potong kecil-kecil hingga beratnya mencapai 100 g.

7.2.2.2 Antara 1 kg sampai dengan 4,5 kg

Dengan menerapkan teknik aseptis, ambil contoh secara acak dan potong kecil kecil hingga beratnya mencapai 300 g.

7.2.2.3 Lebih besar 4,5 kg

Dengan menerapkan teknik aseptis, ambil contoh secara acak dan potong kecil kecil hingga beratnya mencapai 500 g.

CATATAN Contoh beku dilelehkan pada saat akan dianalisa. Pelelehan dilakukan selama 18 jam pada suhu sekitar 2°C-5°C atau pada suhu 45°C tidak selama tidak lebih dari 15 menit.

8 Prosedur

8.1 Persiapan contoh

8.1.1 Produk perikanan selain kekerangan

8.1.1.1 Timbang secara aseptis 25 g contoh sesuai butir 7.2.2.1 dan 7.2.2.2 kemudian tambahkan 225 ml larutan *Alkaline Pepton Water*. Homogenasi selama 2 menit - 3 menit. *Homogenat* ini merupakan larutan dengan pengenceran 1 : 10.

8.1.1.2 Timbang secara aseptis 50 g contoh sesuai butir 7.2.2.3, kemudian tambahkan 450 ml larutan *Alkaline Pepton Water*. Homogenasi selama 2 menit - 3 menit. *Homogenat* ini merupakan larutan dengan pengenceran 1 : 10.

8.1.2 Produk kekerangan

Timbang secara aseptis 50 g contoh sesuai butir 7.2.1, kemudian tambahkan 450 ml larutan *Alkaline Pepton Water*, homogenasi selama 2 menit - 3 menit. *Homogenat* ini merupakan larutan dengan pengenceran 1 : 10.

8.2 Pengkayaan

8.2.1 Contoh produk perikanan selain kekerangan, siapkan 1 set pengenceran dengan cara melarutkan 1 ml *Homogenat* (butir 8.1.1) kedalam 9 ml APW. Lakukan pengenceran sesuai dengan pendugaan kepadatan populasi contoh. Inkubasi pada suhu 36°C ± 1°C selama 6 jam - 8 jam. Goreskan larutan pengkayaan (APW) ke TCBS agar (lihat butir 8.3.1). Inkubasikan kembali APW yang telah digoreskan tersebut selama 16 jam – 24 jam, lalu goreskan kembali ke TCBS agar.

8.2.2 Contoh kekerangan, siapkan 2 set pengenceran dengan cara membagi *Homogenat* (butir 8.1.2) menjadi 2 bagian yang masing-masing mempunyai volume 250 ml. Inkubasikan 1 set pengenceran pada suhu 36°C ± 1°C dan 1 set pengenceran lainnya pada suhu 42°C selama 6 jam – 8 jam. Goreskan larutan pengkayaan ke TCBS agar (lihat butir 8.3.1) dan lanjutkan inkubasi selama 16 jam – 24 jam dan goreskan kembali larutan pengkayaan (APW) ke TCBS agar.

8.3 Isolasi *V. cholerae*

8.3.1 Tanpa mengocok tabung (8.2.1 dan 8.2.2), ambil 1 ose dari setiap tabung yang positif (keruh) pada setiap pengenceran sedalam 1 cm dari permukaan cairan dan goreskan ke dalam TCBS agar. Inkubasikan TCBS agar pada suhu 36°C ± 1°C selama 18 jam - 24 jam.

8.3.2 Amati keberadaan *V. cholerae* pada TCBS agar. Koloni *V. cholerae* besar, permukaan halus, agak datar, bagian tengah buram dan bagian pinggir terang, berwarna kuning (sukrosa positif).

8.4 Pemurnian

Secara hati-hati ambil 3 koloni terduga atau lebih dari setiap TCBS agar, goreskan ke dalam T₁N₁ agar atau TSA + 1,5% NaCl (total mengandung NaCl 2%). Inkubasikan selama 18 jam – 24 jam pada suhu 36°C ± 1°C.

8.5 Uji biokimia pendahuluan

8.5.1 Uji oksidase

Goreskan 1 ose dari T₁N₁ agar atau TSA + NaCl 1,5 % atau *medium* lain yang tidak memfermentasi karbohidrat ke dalam cawan petri yang berisi TSA agar. Inkubasikan pada suhu 36°C ± 1°C selama 18 jam – 24 jam. Teteskan 2 – 3 tetes pereaksi oksidase pada koloni bakteri dan amati reaksinya. Reaksi positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna biru tua pada koloni. Uji oksidase dapat juga dilakukan dengan menggunakan kertas oksidase dengan cara menggoreskan koloni dari T₁N₁ agar atau TSA + NaCl 1,5 % ke atas permukaan kertas oksidase menggunakan tusuk gigi (jangan menggunakan ose yang terbuat dari nikel atau krom). Reaksi positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna biru tua secara cepat.

8.5.2 Uji sensitifitas terhadap 0 / 129 vibriostat

Goreskan 1 ose dengan cepat dari T₁N₁ agar atau TSA + NaCl 1,5 % ke dalam cawan petri yang berisi TSA dengan rapat. Letakkan *disk* 0/129 10 µg dan 150 µg pada goresan yang paling rapat dan inkubasikan pada suhu 36°C ± 1°C selama 18 jam – 24 jam. Amati pertumbuhan disekitar *disk*. Reaksi sensitif ditunjukkan dengan terbentuknya zona disekitar *disk* (S), sedangkan reaksi resisten ditandai dengan adanya pertumbuhan disekeliling *disk* (R). *V. cholerae* sensitif terhadap 0 / 129 10 µg dan 150 µg.

8.5.3 Triple Sugar Iron (TSI) Agar dan Kligger Iron Agar (KIA)

Inokulasikan koloni dari T₁N₁ agar atau TSA + NaCl 1,5 % dengan cara menggores agar miring dan menusuk agar tegak media TSI agar dan KIA. Inkubasikan pada suhu 36°C ± 1°C selama 18 jam – 24 jam. *V. cholerae* menghasilkan asam (warna kuning) pada agar miring, asam (warna kuning) pada agar tegak dan tidak menghasilkan gas serta H₂S. Reaksi *Vibrio* spp dalam beberapa media agar miring yang berbeda dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1 Reaksi *Vibrio* spp dalam beberapa media agar miring yang berbeda

Bakteri	KIA		TSI	
	agar miring	agar tegak	agar miring	agar tegak
<i>V. cholerae</i>	K	A	A (K jarang)	A
<i>V. mimicus</i>	K	A	K (A jarang)	A
<i>V. parahaemolyticus</i>	K	A	K	A
<i>V. alginolyticus</i>	K	A	A	A
<i>V. vulnificus</i>	K atau A	A	K (jarang)	A
<i>A. hydrophilia</i>	K atau A	A	K atau A	A
<i>P. shigeloides</i>	K atau A	A	K atau A	A

Sumber : BAM, FDA, 1998

CATATAN :K adalah *alkaline*

A adalah asam

8.5.4 Uji ONPG

Untuk uji ONPG gunakan kultur dari TSI atau media lain yang mengandung *lactose*. Inokulasikan 1 ose kultur dari TSI ke dalam tabung yang berisi 0,5 ml larutan *physiological saline*. Masukkan 1 *disk* ONPG lalu inkubasikan pada suhu $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ selama 20 menit sampai dengan 1 jam. Reaksi positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna kuning pada media dalam tabung.

8.5.5 Uji oksidatif – fermentatif (OF)

Inokulasikan 2 tabung kedalam media OF yang telah ditambahkan glukosa 1% dengan kultur dari T_1N_1 agar atau TSA + 1,5 % NaCl Tambahkan mineral oil steril setinggi 1 cm - 2 cm kedalam salah satu tabung. Inkubasikan pada suhu $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ selama 1 hari - 2 hari. Reaksi oksidatif ditunjukkan dengan terbentuknya warna kuning (reaksi asam) pada tabung yang tidak ditambahkan dengan mineral oil, sedangkan reaksi fermentatif ditunjukkan dengan terbentuknya warna kuning pada tabung yang ditambahkan mineral oil. Asam mengubah media dari warna hijau menjadi kuning.

8.5.6 Pewarnaan gram

Buat pewarnaan gram dari setiap koloni terduga *V. cholerae*. Kultur diambil dari T_1N_1 agar miring atau TSA miring + NaCl 1,5 % yang telah diinkubasikan selama 24 jam. Bakteri *V. cholerae* termasuk gram-negatif, berbentuk batang pendek atau koma.

8.6 Uji biokimia lanjutan

Lanjutkan pengujian apabila pada uji biokimia pendahuluan diatas ditemukan reaksi *V. cholerae* yang khas (Tabel 1).

Goreskan kembali kultur dari T_1N_1 agar atau TSA + NaCl 1,5 % ke TSA dan TSB. Inkubasikan pada suhu $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ selama 18 jam - 24 jam.

8.6.1 Uji hidrolisis *Urea*.

Inokulasikan 1 ose dari TSA + NaCl 1,5% ke dalam media *Urea*. Inkubasikan pada suhu $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ selama 18 jam. Reaksi positif ditunjukkan dengan perubahan warna media dari orange menjadi merah muda. *Vibrio cholerae* tidak mempunyai kemampuan dalam menghidrolisis *Urea* (reaksi negatif).

8.6.2 Uji Arginin dihidrolase, *Lysine* dekarboksilase, dan ornithin dekarboksilase.

Inokulasikan kultur dari TSA + 1,5% NaCl kedalam 3 tabung media dasar *dekarboksilase* yang masing-masing mengandung arginin, *lysine* dan ornithin serta kedalam 1 tabung kontrol media dasar *dekarboksilase* yang tidak mengandung asam amino. Tambahkan masing-masing tabung dengan mineral oil steril setinggi 1 cm – 2 cm. Inkubasikan pada suhu $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ selama 4 hari. Lakukan pengamatan setiap hari. Reaksi *dekarboksilase* terhadap asam amino menghasilkan pH *alkaline* dan mengubah media menjadi ungu cerah (reaksi positif). Sedangkan reaksi fermentasi glukosa menghasilkan asam dan mengubah media menjadi warna kuning (reaksi negatif). Tabung kontrol yang tidak mengandung asam amino berubah menjadi kuning. *V. cholerae* menghasilkan reaksi arginin dihidrolase negatif, *lysine* dan ornithin positif dan ornithin *Decarboxylase* positif.

8.6.3 Uji toleransi terhadap garam

Inokulasikan kultur dari TSB kedalam 3 tabung yang masing-masing mengandung *Tryptone Broth* 1% yang ditambahkan NaCl 0%; 1%; dan 3% (T_1N_0 , T_1N_1 , T_1N_3). Inkubasikan pada suhu $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, selama 18 jam – 24 jam. Reaksi positif ditandai dengan terjadinya kekeruhan yang menunjukkan pertumbuhan. *V. cholerae* tumbuh dalam media T_1N_0 dan T_1N_3 (Tabel 2).

8.6.4 Uji pertumbuhan pada suhu 42°C

Inokulasikan 1 ose dari TSB yang telah diinkubasikan selama 24 jam kedalam TSB yang telah dihangatkan dalam *Waterbath* 42°C . Inkubasikan pada suhu 42°C dalam *Waterbath* selama 24 jam. Reaksi positif ditandai dengan terjadinya kekeruhan yang menunjukkan adanya pertumbuhan. *V. cholerae* mampu tumbuh pada suhu 42°C (Tabel 2).

8.6.5 Uji *voges-proskauer*

Inokulasikan 1 ose dari TSA + 1,5% NaCl kedalam MR-VP *broth*. Inkubasikan pada suhu $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ selama 2 hari. Pindahkan 1 ml dari setiap MR-VP *broth* yang menunjukkan pertumbuhan ke dalam tabung reaksi ukuran 13 mm x 100 mm steril. Tambahkan 0,6 ml larutan *alphanaphthol* dan 0,2 ml KOH 40% lalu kocok. Tambahkan sedikit kristal kreatin untuk mempercepat reaksi. Kocok kembali dan diamkan selama 2 jam. Reaksi positif ditandai dengan terbentuknya warna merah muda sampai merah mirah delima (*ruby*) pada media. *V. cholerae* menghasilkan reaksi variabel.

8.6.5 Uji fermentasi karbohidrat.

Inokulasikan 1 ose dari TSA + 1,5% NaCl kedalam masing-masing satu tabung *Purple broth Base* yang mengandung *sucrose*, *lactose*, *D-mannitol*, *mannosa*, *arabinosa* atau *cellobiose*. Tambahkan masing-masing tabung dengan mineral oil steril setinggi 1 cm – 2 cm. Inkubasikan pada suhu $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ selama 4 hari - 5 hari dan lakukan pengamatan setiap hari. Reaksi positif fermentasi karbohidrat menghasilkan asam dan mengubah media menjadi kuning (Tabel 2).

8.7 Uji serologi

Ambil 1 ose kultur dari T₁N₁ agar atau TSA + 1,5% NaCl yang telah diinkubasikan selama 16 jam -24 jam dan letakkan diatas gelas preparat. Tetesi dengan larutan *saline* 0,85% dan emulsikan. Letakkan 1 tetes antiserum *Poly Hikojima Inaba-Ogawa* disamping suspensi koloni. Campurkan antiserum sedikit demi sedikit dengan suspensi koloni sampai tercampur sempurna. Lakukan kontrol dengan menggunakan larutan *saline* dan antiserum. Goyangkan campuran tersebut ke kiri dan ke kanan dan amati reaksi penggumpalan pada latar belakang yang gelap sebagai berikut:

Positif apabila terjadi penggumpalan pada larutan kultur dan tidak terjadi penggumpalan pada larutan control.

Negatif apabila tidak terjadi penggumpalan baik pada larutan kultur maupun larutan control.

9 Interpretasi hasil

Tabel 2 Karakteristik minimal uji biokimia untuk identifikasi *V. cholerae*

No	Jenis uji	Interpretasi hasil
1	Morfologi	Gram-negatif, bentuk batang atau koma
2	TSI	Agar miring: asam (kuning) Agar tegak: asam (kuning)
3	Oksidatif / fermentatif (media OF)	Oksidatif positif dan Fermentatif positif
4	<i>Oksidase</i>	Positif
5	<i>Arginin dehidrolase</i>	Negatif
6	<i>Lysine dekarboksilase</i>	Positif
7	VP	Variabel
8	Pertumbuhan pada suhu 42°C	Positif
9	<i>Halophilik</i>	T ₁ N ₀ : positif; T ₁ N ₃ = positif T ₁ N ₆ : negatif
10	Fermentasi <i>sucrose</i>	Positif
11	ONPG	Positif
12	Fermentasi <i>arabinose</i>	Negatif
13	Sensitifitas terhadap 0 / 129	Sensitif (S) terhadap 10 µg dan 150 µg

10 Pelaporan hasil

Laporkan ada atau tidak *Vibrio cholerae* berdasarkan uji biokimia dan serologi.

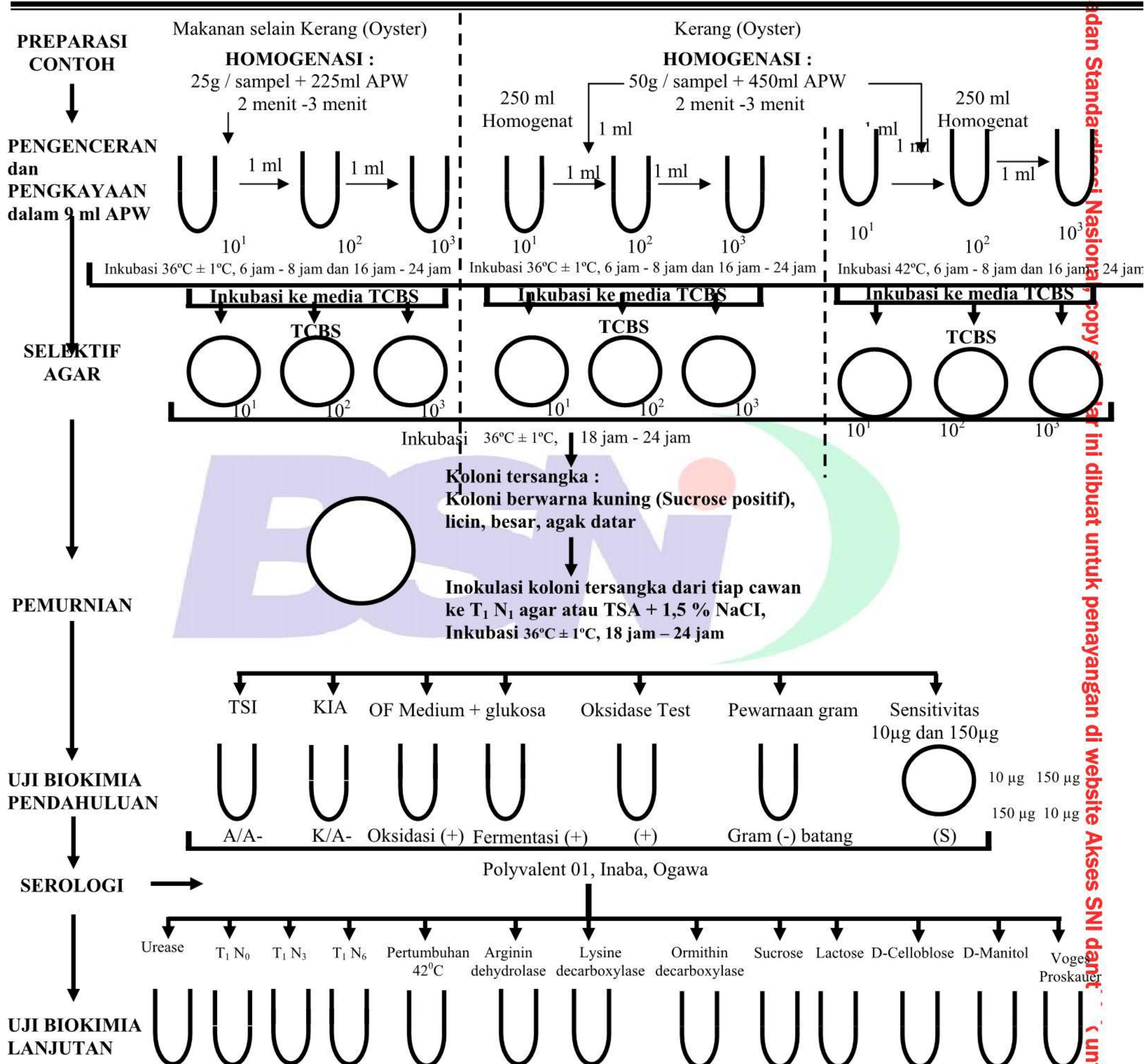
11 Keamanan dan keselamatan kerja

Untuk menjaga keamanan dan keselamatan kerja selama melakukan analisa maka perlu diperhatikan hal-hal sebagai berikut:

- Cuci tangan sebelum dan sesudah melakukan analisa;
- Gunakan jas lab dan masker selama melakukan analisa;
- Lakukan analisa di dalam laminar air flow;
- Bersihkan meja kerja sebelum dan sesudah melakukan analisa dengan bahan desinfektan;
- Bersihkan segera contoh yang tercecer dan mengandung bakteri dengan menggunakan bahan desinfektan;
- Media yang sudah digunakan disterilkan terlebih dahulu sebelum dicuci.

Lampiran A
(normatif)

Skema penentuan *Vibrio cholerae*



Lampiran B (Informatif)

Karakteristik biokimia Vibrionaceae yang terdapat pada makanan laut

		<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. cholerae</i>	<i>V. fluvialis</i>	<i>V. furnissii</i>	<i>V. hollisae</i>	<i>V. metschnikovii</i>	<i>V. mimicus</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>V. vulnificus</i>	<i>A. hydrophila</i> **	<i>P. shigelloides</i> **
TCBS agar		K	K	K	K	H	K	H	H	H	K	H
Oxidase		+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Arginine dihydrolase		-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+
Ornithine Decarboxylase		+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+
Lysine Decarboxylase		+	+	-	-	-	+	+	+	+	V	+
Pertumbuhan w / v):	0% NaCl	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+
	3% NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	6% NaCl	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-
	8% NaCl	+	-	V	+	-	V	-	+	-	-	-
	10% NaCl	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pertumbuhan pada suhu 42°C		+	+	V	-	Td	V	+	+	+	V	+
Asam dari:	Sucrose	+	+	+	+	-	+	-	-	-	V	-
	D-Cellobiose	-	-	+	-	-	-	-	V	+	+	-
	Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	+	V	-
	Arabinose	-	-	+	+	+	-	-	+	-	V	-
	D-Mannose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	V	-
	D-Mannitol	+	+	+	+	-	+	+	+	V	+	-
	ONPG	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-
	Voges-Proskauer	+	V	-	-	-	+	-	-	-	+	-
Sensitifitas terhadap:	10 µg O / 129	R	S	R	R	Td	S	S	R	S	R	S
	150 µg O / 129	S	S	S	S	Td	S	S	S	S	R	S
	Urease	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-

** *Aeromonas hydrophila*, *Plesiomonas shigelloides*

dengan :

TCBS adalah Thiosulfate-Citrate-Bile Salts-Sucrose

K adalah kuning R adalah resisten

H adalah hijau Td adalah tidak dilakukan

S adalah sensitif V adalah variabel

Sumber : BAM, FDA, 1998

Lampiran C (normatif)

Pembuatan media

C.1 *Alkaline Peptone Water (APW)*

<i>Peptone</i>	10 g
NaCl	10 g
Aquades	1 liter

Larutkan semua bahan dalam aquades dan panaskan perlahan lahan. Pipet sebanyak 10 ml ke dalam tabung bertutup. Sterilisasi pada suhu 121°C selama 10 menit dengan tutup tabung dikendurkan. Kencangkan tutup tabung selama penyimpanan dan sesudah inokulasi. pH akhir $8,5 \pm 0,2$.

C.2 *Alkaline Peptone Salt (APS)*

<i>Peptone</i>	10 g
NaCl	30 g
Aquades	1 liter

Larutkan semua bahan dalam aquades dan panaskan perlahan lahan. Pipet sebanyak 10 ml ke dalam tabung bertutup. Sterilisasi pada suhu 121°C selama 10 menit dengan tutup tabung dikendurkan. Kencangkan tutup tabung selama penyimpanan dan sesudah inokulasi. pH akhir $8,5 \pm 0,2$.

C.3 *Decarboxylase Basal medium (Arginin, Lysine, Ornithin)*

<i>Broth Base</i>	
<i>Gelysate</i> atau <i>Peptone</i>	5 g
<i>Yeast extract</i>	3 g
<i>Glucose</i>	1 g
<i>L-lysine</i>	5 g
<i>Bromcresol Purple</i>	0,02 g
Aquades	1 liter

Larutkan semua bahan dalam aquades, panaskan perlahan hingga larut. Untuk arginin broth, tambahkan 5 g L-arginin ke dalam 1 liter *broth Base*; Untuk *lysine broth* tambahkan 5 g *lysine* kedalam 1 liter *broth Base*, tambahkan 5 g L-ornithin kedalam 1 liter *broth Base*. Pipet sebanyak 5 ml dari masing-masing larutan asam amino lalu masukan ke dalam tabung bertutup. Sterilisasi pada suhu 121°C selama 10 menit dengan tutup tabung dikendurkan. Kencangkan tutup tabung selama penyimpanan dan sesudah inokulasi. pH akhir $8,5 \pm 0,2$. Untuk kontrol gunakan *Base* yang tidak diberi suplemen.

C.4 Kligger Iron Agar

<i>PolyPeptone Peptone</i>	20 g
<i>Lactose</i>	20 g
<i>Dekstrose</i>	1 g
<i>NaCl</i>	5 g
<i>Ferric ammonium citrat</i>	0,5 g
<i>Sodium thiosulfate</i>	0,5 g
<i>Agar</i>	15 g
<i>Phenol red</i>	0,025 g
<i>Aquades</i>	1 liter

Larutkan semua bahan dengan aquades hingga larut, panaskan perlahan-lahan hingga mendidih. Masukkan kedalam tabung 13 mm x 100 mm lalu tutup rapat Sterilisasi pada suhu 121°C selama 10 menit dengan tutup tabung dikendurkan. Kencangkan tutup tabung selama penyimpanan dan sesudah inokulasi. pH akhir $7,4 \pm 0,2$. tabung..

C.5 Motility Test Medium (Semisolid)

<i>Beef extract</i>	3 g
<i>Peptone atau Gelysate</i>	10 g
<i>NaCl</i>	5 g
<i>Agar</i>	4 g
<i>Aquades</i>	1 liter

Panaskan sambil diaduk dan didihkan selama 1 – 2 menit untuk melarutkan agar. Sterilisasi pada suhu 121°C selama 15 menit. Dinginkan sampai 45°C. Tuang sebanyak 20 ml kedalam cawan petri steril, tutup dan biarkan kering. Gunakan pada hari yang sama setelah dibuat. pH akhir $7,4 \pm 0,2$.

C.6 MR-VP Broth**Medium 1**

<i>Buffered Peptone-water powder</i>	7 g
<i>Glucose</i>	5 g
<i>K₂HPO₄</i>	5 g
<i>Aquades</i>	1 liter

Medium 2

<i>Pancreatic digest of casein</i>	3,5 g
<i>Peptic digest of animal tissue</i>	3,5 g
<i>Dextrose</i>	5 g
<i>Potassium Phosphate</i>	5 g
<i>Aquades</i>	1 liter

Larutkan bahan-bahan dalam aquadest, panaskan bila perlu. Tuang sebanyak 5 ml kedalam tabung reaksi dan *Autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit. PH akhir $6,9 \pm 0,2$.

C.7 Purple Carbohydrat Fermentation Broth Base

Purple Broth Base	15 g
Aquades	900 ml

Larutkan *Purple broth Base* dalam aquades dan panaskan perlahan hingga suhu 35°C. Pipet sebanyak 9 ml larutan masukan dalam tabung 16 mm x 125 mm yang telah diisi dengan tabung durham. Sterilisasi pada suhu 121°C selama 15 menit. Siapkan larutan karbohidrat 5%, sterilisasi dengan menggunakan filter steril. Tambahkan 1 ml larutan karbohidrat kedalam 9 ml larutan PBB sehingga konsentrasi akhir karbohidrat dalam *broth* mencapai 0,5%. PH akhir 6,8 ± 0,2.

Untuk analisa *Vibrio prahaemolyticus*, tambahkan media dengan NaCl sehingga konsentrasi NaCl akhir sekitar 2% – 3%

C.8 Oxidative-Fermentative (OF) Test Medium

Base	
Peptone	2 g
NaCl	5 g
K ₂ HPO ₄	0,3 g
Bromthymol blue	0,03 g
Agar	2,5 g
Aquades	1 liter

Larutkan bahan dalam aquades lalu panaskan dengan *Hot plate stirer* hingga mendidih. Pipet sebanyak 2,7 ml agar cair lalu masukkan dalam tabung 13 mm x 100 mm. Sterilisasi dengan *Autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit. pH akhir 7,1. **Larutan stok karbohidrat.** Larutkan 10 g karbohidrat dalam 90 ml aquades. Sterilisasi dengan membran filter 0,22 µm. Tambahkan 0,3 ml stok karbohidrat kedalam 2,7 ml *Base* dalam tabung. Kocok agar karbohidrat tercampur sempurna pada suhu ruang. Buat tabung yang sama secara duplo, Salah satu tabung dilapisi dengan mineral oil steril. Inkubasi pada suhu 35°C selama 48 jam.

C.9 Triple Sugar Iron (TSI) Agar

Media 1		Media 2	
<i>PolyPeptone</i>	20 g	<i>Beef extract</i>	3 g
NaCl	5 g	<i>Yeast extract</i>	3 g
<i>Laktose</i>	10 g	<i>Peptone</i>	15 g
<i>Sucrose</i>	10 g	<i>Proteose Peptone</i>	5 g
<i>Glucose</i>	1 g	<i>Glucose</i>	1 g
Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ ·6H ₂ O	0,2 g	<i>Lactose</i>	10 g
Na ₂ S ₂ O ₃	0,2 g	<i>Sucrose</i>	10 g
<i>Phenol red</i>	0,025 g	FeSO ₄	0,2 g
Agar	13 g	NaCl	5 g
Aquades	1 liter	Na ₂ S ₂ O ₃	0,3 g
		<i>Phenol red</i>	0,024 g
		Agar	12 g
		Aquades	1 liter

Kedua media dapat ditukar untuk keperluan umum. Larutkan semua bahan Media I dalam 1 liter aquadest dan panaskan sambil sesekali diaduk. Didihkan selama 1 menit agar semua bahan terlarut. hingga mendidih. Sterilisasi media pada suhu 118°C selama 15 menit. Siapkan media 2 seperti pada media 1, kecuali sterilisasi dilakukan pada suhu 121°C selama 15 menit. Sebelum media menjadi padat, miringkan tabung agar memperoleh agar miring 4-5 cm dan agar dasar 2-3 cm pH akhir $7,3 \pm 0,2$ (Media 1) dan $7,4 \pm 0,2$ (Media 2).

C.10 Thiosulfate-Citrate-Bile Salts-Sucrose (TCBS) Agar

<i>Yeast extract</i>	5 g
<i>Peptone</i>	10 g
<i>Sucrose</i>	20 g
<i>Sodiumthiosulfate</i> 5 H ₂ O	10 g
<i>Sodiumcitrate</i> 2H ₂ O	10 g
<i>Sodium cholate</i>	3 g
<i>Oxgall</i>	5 g
Na Cl	10 g
<i>Ferric citrate</i>	1 g
<i>Bromthymol blue</i>	0,04 g
<i>Thymolblue</i>	0,04 g
Agar	15 g
Aquades	1 liter

Siapkan labu *erlenmeyer* yang berukuran lebih besar dari volume media yang akan dibuat. Larutkan seluruh bahan dalam aquades hangat dan panaskan hingga larut. Setelah mendidih cepat angkat. Jangan di *autoclave*. Dinginkan hingga suhu 50°C dan tuang kedalam cawan petri steril. Keringkan cawan petri tersebut selama 1 malam atau pada suhu 37°C - 45°C sebelum digunakan.

C.11 Tryptone (Tryptophane) Broth 1%

<i>Tryptone</i> atau <i>Trypticase</i>	10 g
Aquadest	1 liter

Larutkan semua bahan dan pindahkan sebanyak 5 ml tabung reaksi. Sterilisasi pada suhu 121°C selama 15. pH akhir $6,9 \pm 0,2$.

C.12 Trypticase (tryptic) Soy Agar

<i>Trypticase Peptone</i>	15 g
<i>Tryptone Peptone</i>	5 g
NaCl	5 g
Agar	15 g
Aquades	1 liter

Larutkan semua bahan dan didihkan. Sterilisasi pada suhu 121°C selama 15 menit. pH akhir $7,3 \pm 0,2$

C.13 Tryptone Broth and Tryptone Salt Broths (T_1N_0 , T_1N_1 T_1N_3 T_1N_6 T_1N_8 T_1N_{10})

<i>Trypticase</i> atau <i>Tryptone</i>	10 g
NaCl	0 g, 10 g, 30 g, 60 g, 80 g, 100 g
Aquades	1 liter

Larutkan semua bahan dalam aquades. Untuk T_1N_0 tanpa penambahan NaCl; untuk T_1N_1 gunakan 10 g NaCl (1% w / v NaCl) dan seterusnya. Tuang ke dalam tabung bertutup ukuran 16 x 125 mm. Tutup rapat tabung untuk mempertahankan konsentrasi garam yang terdapat dalam larutan tersebut. Sterilisasi pada suhu 121°C selama 15 menit. pH akhir $7,2 \pm 0,2$.

C.14 Urea Broth

<i>Urea</i>	20 g
<i>Yeast extract</i>	0,1 g
Na_2HPO_4	9,5 g
K_2HPO_4	9,1 g
<i>Phenol red</i>	0,01 g
Aquades	1 liter

Larutkan semua bahan dalam 1 liter aquadest. **Jangan dipanaskan.** Sterilisasi menggunakan membran filter 0,45 μm . Pindahkan 0,1 ml -3,0 ml ke dalam tabung steril. pH akhir $6,8 \pm 0,2$.

Lampiran D (normatif)

Pembuatan pereaksi

D.1 Pereaksi Kovacs'

<i>P-DimEthylaminobenzaldehyde</i>	5 g
<i>Amyl Alcohol</i> (normal)	75 ml
HCl (pekat)	25 ml

Larutkan *P-DimEthylaminobenzaldehyde* dalam *Amyl Alcohol* normal. Tambahkan HCl perlahan-lahan. Simpan pada suhu 4°C. Untuk uji indol, tambahkan 0,2 ml – 0,3 ml reagen kedalam 5 ml kultur *Tryptone broth* yang diinkubasi 24 jam. Terbentuknya cincin merah pada permukaan menunjukkan hasil yang positif.

D.2 Mineral (Parafin) oil

Pereaksi ini tersedia secara komersial

D.3 O / 129 (2,4-diamino-6,7-diisopropyl pteridine) disk, 10 µg dan 150 µg

Pereaksi ini tersedia secara komersial

D.4 Uji ONPG

Larutan *Monosodiumphosphat* 1,0M pH 7

Na H ₂ PO ₄ .H ₂ O	6,9 g
Aquades	45 ml
Larutan NaOH 30%(w/v)	3 ml

Larutkan Na H₂ PO₄ .H₂O dalam aquades. Tambahkan larutan NaOH 30% dan atur pH menjadi 7. Tepatkan volume dengan aquades dan simpan dalam *refrigerator* (kira-kira 4°C).

0,0133 M o-Nitrophenyl-beta-D-galaktoside(ONPG)

ONPG	80 mg
Aquades, 37°C	15 ml
Larutan <i>Monosodiumphosphat</i> 1,0M pH 7	5 ml

Larutkan ONPG dalam aquades 37°C. Tambahkan larutan 1,0M Na H₂PO₄. Larutan ini tidak berwarna. Simpan dalam *refrigerator* (kira-kira 4°C). sebelum digunakan, panaskan sesuai kebutuhan larutan ONPG pada suhu 37°C.

D.5 Peraksi oksidase

N,N,N, N – *TetramEthyl-p-phenylenediamine* 2 HCl 1 g

Aquades 100 ml

Siapkan peraksi dalam kondisi segar. Peraksi ini dapat disimpan hingga 7 hari dalam botol gelas gelap dalam *refrigerator*.

D.6 1N Hydrochloric acid

HCl 89 ml

Aquades untuk melarutkan hingga 1 liter

D.7 Larutan Physiological saline 0,85%

NaCl 8,5 g

Aquadest 1 liter

Larutkan 8,5 g NaCl dalam aquadest. Sterilisasikan pada suhu 121°C selama 15 menit.

D.8 Phosphate Buffered Saline (PBS), pH 7,4

NaCl 7,650 g

Na₂ H PO₄ , *anhydrous* 0,724 g

K H₂ PO₄ 0,210 g

Aquades 1 liter

Larutkan seluruh bahan dalam aquades. Atur pH menjadi 7,4 dengan 1 N NaOH. Sterilisasi pada suhu 121°C selama 15 menit.

D.9 Larutan 2% atau 3% NaClLarutan 2% NaCl

NaCl 20 g

Aquades 1 liter

Larutan 3% NaCl

NaCl 30 g

Aquades 1 liter

Larutkan bahan dalam aquades. Sterilisasi pada suhu 121°C selama 15 menit, pH akhir 7,0.

D.10 Larutan 1 N Sodium Hydroxide Solution

NaOH 40 g

Aquades 100 ml

Larutkan NaOH dalam aquades

D. 11 Peraksi VP**Larutan 1**

<i>Alpha-naphtol</i>	5 g
<i>Alcohol</i> (absolut)	100 ml

Larutan 2

<i>Potassium hydroxide</i>	40 g
Aquades	100 ml

Uji VP.

Pindahkan 1 ml kultur 48 jam kedalam tabung reaksi dan tambahkan 0,6 ml larutan 1 dan 0,2 ml larutan 2. Kocok setelah penambahan larutan. Untuk mempercepat reaksi, tambahkan kristal creatine kedalam campuran larutan. Biarkan pada suhu ruang. Baca hasilnya setelah 4 jam. Pembentukan warna eosin pink menunjukkan hasil yang positif.

D.12 Pereaksi pewarnaan Gram***Hucker's Crystal violet*****Larutan A**

<i>Crystal violet</i>	2 g
<i>Ethyl Alcohol</i> , 95 %	20 ml

Larutan B

<i>Ammonium oxalat</i>	0,8 g
Aquades	80 ml

Campur larutan A dan B. Simpan selama 24 jam dan saring dengan kertas saring

Gram's Iodine

<i>Iodine</i>	1 g
<i>Potassium Iodine</i>	2 g
Aquades	300 ml

Masukkan KJ dalam mortar, tambahkan *Iodine* dan gerus dengan alat penggiling selama 5-10 detik. Tambahkan 1 ml air dan gerus kemudian tambahkan 5 ml. Tambahkan lagi 10 ml dan gerus. Tuang larutan ini dalam botol pereaksi. Bilas mortar dan alat penggilingnya dan tambahkan air hingga volume 300 ml.

***Hucker's Counterstain* (larutan stok)**

<i>Safranin O</i>	2,5 g
<i>Ethanol</i> , 95 5	100 ml

Larutan kerja : larutkan 10 ml larutan stok ke dalam 90 ml aquades

Prosedur pewarnaan:

Buat usapan bakteri yang akan diwarnai diatas gelas preparat. Usahkan usapan yang dibuat setipis mungkin. Fiksasi gelas preparat tersebut dengan melewati melalui api burner. Warna film selama 1 menit dengan larutan *Hucker's Crystal violet* dan cuci sebentar dengan air. Bubuhkan larutan g *Iodine* selama 1 menit. Cuci dengan air mengalir. Lakukan dekolorisasi (penghilangan warna) dengan *Ethanol* 95% hingga seluruh warna biru hilang (kira-kira 30 detik). Cuci kembali dengan air mengalir. Bubuhkan larutan *Hucker's Counterstain (Safranin)* selama 1 menit dan cuci kembali dengan air mengalir, keringkan dan periksa di bawah mikroskop.



Bibliografi

Food and Drug Administration, Bacteriological Analytical Manual. 8th edition, 1998, Chapter 9, AOAC International.

BPPMHP, 2005. *Laporan verifikasi metode pengujian V. cholerae*, Balai Pengembangan dan Pengujian Mutu Hasil Perikanan, Jakarta











BADAN STANDARDISASI NASIONAL - BSN
Gedung Manggala Wanabakti Blok IV Lt. 3-4
Jl. Jend. Gatot Subroto, Senayan Jakarta 10270
Telp: 021- 574 7043; Faks: 021- 5747045; e-mail : bsn@bsn.go.id